

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：37601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580080

研究課題名(和文) 昆虫の過変態を支配する遺伝子と内分泌機構の解明

研究課題名(英文) Genetic and endocrine control of insect hypermetamorphosis

研究代表者

新谷 喜紀 (Shintani, Yoshinori)

南九州大学・環境園芸学部・教授

研究者番号：50389574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の過変態における遺伝子発現や内分泌機構を調べるために、過変態昆虫の代表であるマメハンミョウについて、同じ温度のもとで光周期だけの違いによって、4齢から5齢への変態(擬蛹化)と4齢からの直接の蛹化を調節できる飼育条件を見つけ出した。このように、擬蛹化と蛹化予定の幼虫を産み出すことが可能になったので、それぞれの幼虫における遺伝子発現の差異をRNA-seqによって調べたところ、コクヌストモドキなどモデル昆虫で知られている変態のキー遺伝子の発現に差異がみられた。

研究成果の概要(英文)：Genetic and endocrine control of insect hypermetamorphosis was examined for *Epicauta gorhami*. Larvae showed a long-day photoperiodic response at 25°C when the food condition is regulated; larvae directly pupated under long-day conditions whereas they enter pseudopupal diapause under short-day conditions. RNA-seq analysis of the larvae that were destined to pupate or enter diapause indicated that gene expression profiles of some genes known as keys for metamorphosis in model insects are different between them.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：過変態 遺伝子発現 内分泌機構 マメハンミョウ 擬蛹 休眠 表現型可塑性 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

すべての昆虫がそのライフサイクルの中に変態を組み込んでいるが、この変態こそが昆虫の繁栄をもたらした要因の一つだと考えられている。昆虫の変態は蛹期の有無によって不完全変態と完全変態の2タイプに分類されるが、完全変態昆虫の中のある限られた分類群においては、幼虫期の脱皮の前後でその形態を劇的に変化させる特殊な発育を行うものがある。この特殊な幼虫発育は「過変態」と呼ばれる。過変態昆虫の代表はコウチュウ目ツチハンミョウ科であり、その一つにマメハンミョウがある。通常の脱皮や変態を制御する内分泌や遺伝子発現の分子機構の一部は、多くの研究者によって明らかにされつつあるものの、過変態に関しての分子機構の研究は皆無である。

昆虫において脱皮や変態と密接に関連した現象として休眠がある。休眠は発育過程の中のある段階で起こる自律的な発育の停止で、これによって昆虫は環境の季節的な変化に適応している。即ち、発育に不適な季節を耐性の高い休眠状態で過ごす仕組みとなっている。休眠も脱皮・変態と同様に内分泌によって支配されている。脱皮や変態の抑制が休眠でもあることから、変態・脱皮と休眠には一部共通した内分泌系が関与している。多くの昆虫の場合、休眠の誘導は光周性によって支配され、冬の休眠は秋の短日条件によって誘導される。

マメハンミョウの幼虫は土中に産下されたバツタ類の卵のみを食べて育つ。バツタ卵は入手しにくく、これが飼育のネックとなっていたが、改良を重ねて本種の累代飼育に成功した。幼虫は1齢から2齢になる時と4齢から5齢になる時に大きな形態の変化がある。5齢は赤褐色の硬化した皮膚を持つ擬蛹と呼ばれるステージであり、このステージになることがツチハンミョウ科の過変態の際立った特徴である。擬蛹は、口器や脚、筋肉などが退化していて動かない。また、擬蛹は本種の生活史における越冬のための休眠ステージである。低温を経験することによって休眠が終了し脱皮をして6齢(2~4齢と同形)となりやがて蛹化する。

昆虫の脱皮・変態や休眠には脱皮ホルモン(エクジソン)や幼若ホルモン(JH)が関与していることは古くから知られているが、本種の過変態に、他昆虫の脱皮や変態とは異なる因子が関与していることは間違いない。過変態の分子機構を解明することは、昆虫の季節適応や発育過程の進化を理解するうえで非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

マメハンミョウは幼虫期に経験する温度や光周期などの条件によって、4齢幼虫から

5齢(休眠)を経ずに蛹化を誘導できることがわかっている(Shintani et al., 2011)。さらに、予備的な実験から餌条件を調節することによって、同じ温度の下で光周期のみの違いで蛹化または擬蛹化の個体を産み出すことができることが示唆されている。本研究では、まずこの蛹化/擬蛹化を誘導する条件について検討する。

この結果を受けて、蛹になる予定の虫と擬蛹になる予定の虫を作り出し、それらの間で発現量の異なる遺伝子を見つけて機能解析を行うことにより、蛹化/擬蛹化の調節に関わる遺伝子を同定する。さらに、光周期処理やホルモン処理後の擬蛹化遺伝子の発現量の変化を調べることにより、それらの発現制御機構を明らかにする。これらの実験の結果をもとに、ホルモン応答や擬蛹化の遺伝子カスケードを明らかにし、一般の昆虫の脱皮・変態の制御機構と過変態の制御機構の共通点や相違点を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 蛹化/擬蛹化を誘導する環境条件

マメハンミョウ幼虫の擬蛹化または蛹化が温度や日長によって制御されることを明らかにしているが、さらに他昆虫で知られているような餌条件が変態に及ぼす影響について調べる。即ち、4齢幼虫時に餌を除去することによって休眠の傾向が低下したり、蛹化が促進されたりする現象(早熟変態)について検討する。これによって、その後の実験で必要となってくる、蛹または擬蛹のいずれになるのかが決定した4齢幼虫が準備できるようになる。具体的には、25℃の下で餌(トノサマバツタ卵)を飽食させた場合と、4齢脱皮日に餌を除去して絶食させた場合の光周反応曲線を比較して、餌条件が蛹化/擬蛹化の光周反応曲線を比較する。

(2) 過変態に関連する遺伝子の探索

擬蛹と蛹のどちらのステージのようになるかが決定した4齢幼虫を準備し、mRNAの発現量に違いのある遺伝子を探索する。次世代シーケンサーIllumina HiSeq 2000によってトランスクリプトーム解析(RNA-seq)を行い、発現している遺伝子を網羅的に解析する。

また、蛹化/擬蛹化の両方の場合について、1日ごとにサンプリングを行い、遺伝子発現の経時変動を調べられるようにしておく。サンプルは凍結保存させ、必要に応じてキット類を用いてmRNAを精製し逆転写してcDNAライブラリーを作製する。RNA-seqの結果を相同性から機能を類推するアノテーションを行い候補遺伝子を絞り込む。同時に得られている塩基配列情報を基にして、数組の遺伝子特異的なプライマーを作製する。このプライマーを使って、cDNAライブラリーからの遺伝子のクローニングをしたり、日齢ごとの遺

伝子発現変動を定量 qPCR によって調べたりする。蛹化と擬蛹化の間で発現パターンが異なり、また他の昆虫の変態時の発現パターンとも異なることが予想される。

4. 研究成果

(1) 蛹化/擬蛹化を誘導する環境条件

25 の下で餌条件によって蛹化/擬蛹化が調節できないかを検討した。飽食させた場合は長日(16L-8D)で過半数の個体が擬蛹化し、短日(12L-12D)で全個体が擬蛹化するような光周反応曲線が見られた(図1)。ところが4齢脱皮日に餌を除去すると、全体的に擬蛹化の傾向が低下し、蛹化が促進される現象が観察された。蛹化する場合も擬蛹化する場合も絶食から変態までの時間は飽食させた場合と比べて短く、結果的に幼虫期間が短くなる早熟変態起こっていると考えられた。この光周反応の臨界日長は飽食の場合と比べて短く、また臨界日長付近の曲線の傾きが急であることから、野外における早熟変態の適応的意義は、餌の枯渇時に休眠を避けて2化目の成虫として出現して繁殖することだと考えられる。これは、バッタの卵という限られた資源を利用するという本種特有の食性と関係して進化したものであると考えられた。マメハンミョウは野外では部分的に2化性になっていると考えられる。

この結果はまた、25 という同一の温度の下で、長日(16L-8D)と短日(12L-12D)で飼育して、それぞれで蛹化個体と擬蛹化個体を産み出すことができることを示唆している。

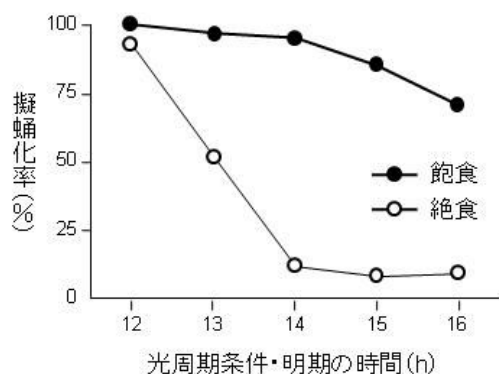


図1. マメハンミョウ幼虫における摂食条件が光周反応に及ぼす影響(25)。飽食させるかまたは4齢に脱皮した日に餌を取り除いて絶食させた。

(2) 過変態に関連する遺伝子の探索

上記の結果を基にして、蛹化予定/擬蛹化予定幼虫が得られることとなった。蛹化直前と擬蛹化直前の幼虫についてRNA-seqを行った結果、発現に有意な差異のある遺伝子は多

数見つかったが、モデル昆虫で変態に関係していると考えられている転写因子のKr-h1 遺伝子など転写因子も含まれていた。さらにこれらの中には、モデル昆虫の終齢幼虫(蛹化直前)での発現と比べて、擬蛹化する場合には異なる発現変動を示すものもあった。これらについては、得られているcDNAの塩基配列から特異的なプライマーを作製してクローニングし、qPCRを行った。まとまったデータを示すには至っていないが、このデータを基にして、RNAiなどの方法によって機能解析を行い、蛹化/擬蛹化を調節している遺伝子や遺伝子群のカスケードを明らかにしていく基盤が整った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Terao, M., Hirose, Y. and Shintani, Y. (2015) Food-availability dependent premature metamorphosis in the bean blister beetle, *Epicauta gorhami* (Coleoptera: Meloidae), a hypermetamorphic insect that feeds on grasshopper eggs in the larval stage. *Entomological Science* 18: 85-93.

新谷 喜紀 (2014) 過変態昆虫マメハンミョウの生活史調節機構. *昆虫と自然* 49 (12): 21-24. 北隆館ニューサイエンス社.

Terao, M., Hirose, Y. and Shintani, Y. (2012) Effects of temperature and photoperiod on termination of pseudopupal diapause in the bean blister beetle, *Epicauta gorhami*. *Journal of Insect Physiology* 58: 737-742.

[学会発表](計7件)

新谷喜紀・寺尾美里・田中誠二 マメハンミョウ幼虫の簡易飼育法. 日本応用動物昆虫学会 2014年3月 高知

新谷喜紀 過変態昆虫マメハンミョウの生活史調節機構. 九州昆虫セミナー(日本昆虫学会九州支部会) 2013年10月 佐賀

新谷喜紀 過変態昆虫マメハンミョウの環境適応(小集会). 日本昆虫学会 2013年9月 札幌

新谷喜紀・寺尾美里・廣瀬譲 マメハンミョウ幼虫における早熟変態の適応的意義. 九州病害虫研究会 2012年11月 福岡

寺尾美里・新谷喜紀 マメハンミョウの早熟変態個体は繁殖できるのか. 日本昆虫学会 2012年9月 町田

Shintani, Y., Terao, M. and Hirose, Y. Effects of temperature and photoperiod on hypermetamorphosis in the been

blister beetle, *Epicauta gorhami*. 国際
昆虫学会議 2012年8月 大邱(韓国)
寺尾美里・廣瀬謙・新谷喜紀 マメハ
ンミョウの擬蛹休眠の誘導に及ぼす環境
要因の効果 日本応用動物昆虫学会 2012
年3月 奈良

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 喜紀 (SHINTANI, Yoshinori)
南九州大学・環境園芸学部・教授
研究者番号: 50389574

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田中 誠二 (TANAKA, Seiji)
国立研究開発法人 農業生物資源研究所・昆
虫科 科学研究領域 昆虫 - 昆虫・植物間相
互作用研究ユニット・上級研究員
研究者番号: 50370664

篠田 徹郎 (SHINODA, Tetsuro)
国立研究開発法人 農業生物資源研究所・昆
虫科学研究領域 制御剤標的遺伝子研究
ユニット・ユニット長
研究者番号: 10355620